

红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养

陈俊^{1,2} 陆俊锟¹ 康丽华^{1*} 杨振德²

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所 广东 广州 510520)

(2. 广西大学林学院 广西 南宁 530004)

摘要: 对分离来自华南红树林的溶磷菌进行 16S rDNA 或 ITS 等基因水平上的初步鉴定, 测定其溶解无机磷的能力, 并对溶磷菌的生长培养基条件进行优化。结果表明, 溶磷真菌的溶磷效果明显强于溶磷细菌, 且溶磷真菌的溶解无机磷能力与培养液的 pH 呈极显著负相关, 而溶磷细菌的溶磷能力与 pH 没显著相关关系。单因素实验表明, 对供试菌株生长的合适碳源为麦芽糖, 氮源为尿素。通过正交实验得到的优化培养基为麦芽糖 5 g/L、尿素 0.05 g/L、NaCl 5 g/L、pH 5, 在 30°C 下培养 48 h 菌落总数可达 6.06×10^9 CFU/mL。

关键词: 红树林, 溶磷菌, 溶磷能力, 优化培养

Primary Identification, Capability of Phosphate-Solubilization and Optimization of Medium of Some Microorganism from Mangrove

CHEN Jun^{1,2} LU Jun-Kun¹ KANG Li-Hua^{1*} YANG Zhen-De²

(1. *Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou, Guangdong 510520, China*)

(2. *Forestry College of Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China*)

Abstract: The genetic identification of 16S rDNA or ITS, capability of phosphate-solubilization and pH of medium, and optimization of medium of some microorganism isolated from mangrove were investigated in this study. The result showed that the fungi normally had much higher capacity to dissolve the inorganic phosphate than the bacteria, the capacity of the fungi was closely correlated to the pH of medium, but the relationship was weak for the bacteria. It was illustrated by single factor experiments that the optimal carbon and nitrogen sources were maltose and urea respectively. The orthogonal design was employed in testing the optimum composition of medium composed of 5 g/L maltose, 0.05 g/L urea, 5 g/L NaCl, pH 5. In this optimal medium, the effectively enrichment of bacteria could reach up to 6.06×10^9 CFU/mL under 30°C for 48 hours cultivation.

Keywords: Mangrove, Phosphate-solubilizing microorganism, Phosphate solubilization capacity, Optimized culture

磷是植物营养中的三大要素之一,又是植物体内有机化合物的重要组成成分,对其生长发育都起着不可忽视的作用。土壤中的磷素主要以磷灰石、磷酸钙和有机磷的形式存在,植物难以吸收利用^[1]。红树林具有独特的生态地位和宝贵的生物资源,但红树植物周期性生长在海水中,间隙水富含阳离子,磷酸盐通常沉淀在底泥中,导致大量的磷元素不能被红树植物所利用^[2],开发利用这些磷元素,对红树林的保护与发展具有重要的意义。

土壤与植物根际中存在着大量的溶磷菌,包括细菌、放线菌和真菌^[3]。溶磷菌的研究也一直受到植物学、微生物学以及农学等不同领域专家的重视,并进行了大量的溶磷菌接种研究^[4,5],提高土壤难溶磷的有效性和磷肥的利用效率,促进植物生长都具有重要意义。由于不同种类的溶磷菌或同种不同菌株之间的溶磷能力都有明显的差异,所以筛选出具有高效溶磷能力的菌株显得尤为重要。本文对筛选自华南地区的红树林溶磷菌进行溶解无机磷能力的测定,并对溶磷菌的培养条件进行优化,旨在为红树林菌肥的生产提供高效以及稳定的菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种来源与鉴定

供试菌株是本实验室从红树植物根际中分离出来的,细菌分别为 SZ009、SZ7-2、HN007、FJ002、HN012、HN1-3 和 HN3-2;真菌为 FJ019 和 FJ022。

1.1.1 溶磷细菌的总 DNA 提取及 16S rDNA 基因扩增:参照 Wen&Tsong 的快速提取法^[6]提取菌株 DNA。引物分别原核生物 16S rDNA 的通用引物 F27: 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3'和 R1492: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG T-3'。扩增条件为 95°C 5 min; 95°C 1 min, 56.7°C 50 s, 72°C 1 min, 32 个循环; 72°C 10 min。16S rDNA PCR 产物全序列由上海生工生物公司测定。

1.1.2 溶磷真菌的总 DNA 提取及 ITS 基因扩增:刮取少量培养 24 h 的菌丝体,转至液氮中研磨, DNA 的抽提采用改进的 CTAB 法^[7]。ITS 区域扩增选择真核生物 ITS 通用引物 ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GC GC-3'和 ITS4: 5'-TCC TCC GC TTA TTGA TA TGC-3'。PCR 反应条件为 95°C 5 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经试剂盒纯化后送至上海生工生物工程公司

测序。

1.2 溶磷能力的测定

1.2.1 溶磷菌溶磷能力的定性测定:将待测的菌株先在 LB 固体培养基^[8]上活化,然后用灭菌牙签点接种菌株至固体改良 SRSM 培养基^[9]上。每菌株在一个皿上接 4 个重复。在 28°C 培养箱中培养 5 d 后观察菌株透明圈的大小。

1.2.2 溶磷菌溶磷能力的定量测定:将不加磷的改良 SRSM 液体培养基 100 mL 分装在 250 mL 三角瓶中,灭菌后精确加入 0.5 g 灭菌 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 粉,加入 1 mL 已培养 24 h 的菌液, 28°C~30°C, 120 r/min 摇床培养,分别在 48 h、72 h、96 h 及 120 h 测定菌株溶解无机磷能力。测定方法为混匀菌株培养液,吸取 1 mL, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行钼锑抗比色法^[10]测定其溶磷量,同时测定培养液的 pH 值。每菌株试验重复 3 次。

1.3 培养基优化实验

1.3.1 碳源和氮源的筛选:选取代表菌株进行培养基优化实验。在原有改良 SRSM 液体培养基的基础上首先对碳源(葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖)和氮源 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、Urea、 NH_4NO_3]进行筛选。菌株在 LB 液体培养基活化 24 h 后,按 1%接种量接种于各碳源、氮源培养基,于 30°C、130 r/min 条件下培养 48 h 后,在波长 600 nm 下测定光密度(OD)。

1.3.2 培养基组成的优化:确定最好的碳源和氮源后,以 HN3-2 为供试菌株,设计了麦芽糖(0.5 g/L, 5 g/L, 15 g/L), 尿素(0.05 g/L, 0.5 g/L, 2 g/L), NaCl (5 g/L, 20 g/L, 50 g/L), pH (5, 7, 9)的四因素三水平的正交实验对培养基进行优化。选用 $L_9(3^4)$ 正交组合进行实验,其因素水平见表 5。

各培养基都经 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 测定光密度方法同 1.3.1。

1.4 优化培养基与基础培养基对溶磷菌生长情况的比较

选取正交实验结果的最优培养基配方与改良 SRSM 液体培养基配方在同条件下培养, 48 h 后测定菌液 OD 值并稀释菌液到 10^{-7} 涂于相应的培养基平板上,菌落计数采用 Shineso 全自动菌落计数仪。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

16S rDNA 由于其高度保守性广泛应用于细菌的

鉴定,随着分子技术的发展,越来越多的细菌 16S rDNA 序列被测定并收录在 GenBank,为菌种的鉴定提供了快捷、方便的平台。本实验室保存的 7 株细菌,经 16S rDNA 扩增、测序,经 Blast 比对,各菌株与 GenBank 中的比对菌株具有高的相似性水平,具体见表 1。其中, *Bacillus megaterium* 目前已成为工业应用并取得较好田间试验的溶磷菌之一^[11,12],而 *Vibrio* sp.^[13]与 *Enterobacter* sp.^[14]等溶磷细菌也有研究报道。

另外两株真菌利用 ITS 基因进行分析鉴定。ITS 是介于 18S rDNA、5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的区域,该区域进化速度较编码区快,在种内不同菌株间高度保守,而在真菌的种间存在着丰富的变化,近年来广泛应用于真菌的系统发育、分类鉴定和分子检

测。通过 Blast 结果表明,两株真菌均为 *Penicillium* spp.,而从以往的研究发现, *Penicillium* spp.^[15]具有较强的溶磷能力。

2.2 溶磷菌溶磷能力的定性测定

9 株溶磷菌在培养 120 h 后产生溶磷圈直径的结果见表 2。各菌株在固体培养基上产生了不同程度大小的溶磷圈,溶磷圈是指在微生物溶磷机理的作用下使无机磷固体培养基中的难溶性磷酸盐溶解,而在菌落周围形成一定的透明圈。产生溶磷圈的大小,大致可说明此溶磷菌分解无机磷能力的强弱,从而可初步判断溶磷菌溶磷能力^[16]。结果所示,各溶磷菌所产生的溶磷圈的直径从 11 mm~34 mm,表现出溶磷菌具有不同程度的溶磷能力,其中 SZ009 所产生的溶磷圈最大,达 34 mm。

表 1 溶磷菌的 16S rDNA 及 ITS 基因的鉴定结果
Table 1 Identification of 16S rDNA and ITS gene

菌株 Strain	宿主植物 Host plant	GenBank 数据库中最接近的亲缘关系 Closest relatives in GenBank database	相似性 Similarity(%)	登录号 GenBank accession number
HN3-2	秋茄 <i>Kandelia candel</i>	<i>Allomonas enterica</i>	99	EU077543
HN1-3	木榄 <i>Bruguiera gymnoihsa</i>	<i>Paenibacillus ginsengagri</i>	98	EU596538
HN007	<i>B. gymnorrhiza</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	99	EU256402
HN012	<i>K. candel</i>	<i>Vibrio</i> sp.	99	EU077545
SZ7-2	<i>K. candel</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	99	EU256398
SZ009	<i>K. candel</i>	<i>Enterobacter intermedius</i>	98	EU596536
FJ002	<i>B. gymnorrhiza</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	99	EU256391
FJ019	<i>B. gymnorrhiza</i>	<i>Penicillium</i> spp.	99	-
FJ022	<i>K. candel</i>	<i>Penicillium</i> spp.	99	-

表 2 溶磷菌的溶磷能力
Table 2 Solubilization of insoluble phosphates by microorganism

菌株 Strain	溶磷圈 Halo (mm)	48 h		72 h		96 h		120 h	
		pH	溶磷量 Phosphate solubilization capacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	pH	溶磷量 Phosphate solubilization capacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	pH	溶磷量 Phosphate solubilization capacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	pH	溶磷量 Phosphate solu- bilization ca- pacity ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
SZ7-2	13 \pm 1.15 fg	5.4	63.22 \pm 3.20 c	3.9	76.08 \pm 4.32 b	4.0	52.52 \pm 2.65 d	5.2	44.65 \pm 1.79 ef
SZ009	34 \pm 2.52 a	4.0	53.71 \pm 4.06 d	3.7	68.92 \pm 6.20 cd	4.0	45.90 \pm 5.62 e	3.9	38.00 \pm 2.84 g
HN1-3	16 \pm 0.58 de	6.7	53.2 \pm 2.45 d	4.8	68.07 \pm 2.35 bc	4.6	59.38 \pm 4.13 cd	4.5	52.88 \pm 2.21 e
HN3-2	18 \pm 1.00 bc	5.0	84.3 \pm 3.78 a	4.6	90.95 \pm 4.95 a	5.0	84.45 \pm 1.10 b	5.1	71.20 \pm 1.28 c
HN007	16 \pm 0.58 cd	5.1	70.55 \pm 1.91 b	5.5	68.13 \pm 0.68 bc	5.7	64.72 \pm 1.28 c	5.9	49.56 \pm 2.10 ef
HN012	15 \pm 2.08 ef	4.8	85.02 \pm 6.86 a	4.7	86.43 \pm 2.61 a	5.6	62.35 \pm 1.26 c	5.6	61.08 \pm 0.82 d
FJ002	11 \pm 1.53 g	6.8	50.22 \pm 2.69 d	5.6	56.67 \pm 0.95 d	5.8	57.66 \pm 1.89 cd	6.0	45.89 \pm 4.19 f
FJ019	19 \pm 0.58 b	8.1	3.23 \pm 0.97 f	6.7	7.75 \pm 1.11 f	3.5	79.62 \pm 1.83 b	3.1	96.73 \pm 0.97 b
FJ022	14 \pm 0.58 f	8.3	21.59 \pm 3.14 e	8.1	43.22 \pm 3.72 e	3.7	93.29 \pm 1.22 a	3.2	105.52 \pm 1.05 a

Note: Means in a column with the same letter are not significantly differ at the level of $P=0.05$.

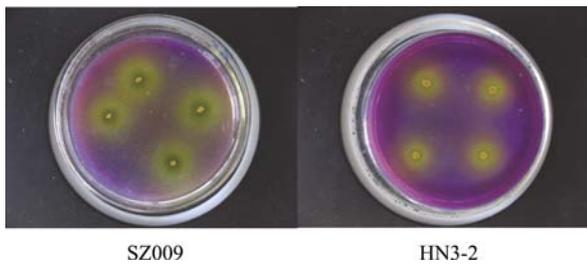


图1 供试溶磷菌产生的溶磷圈(120 h)

Fig. 1 Halo of phosphate-solubilization microorganism in solid media (120 h)

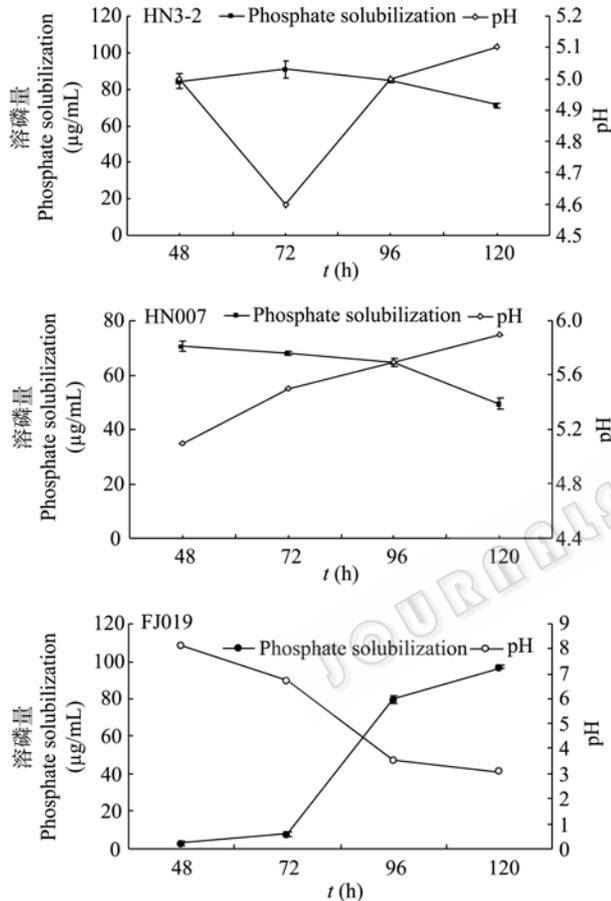


图2 溶磷菌培养液中溶磷量与 pH 的关系

Fig. 2 The relationship between the medium pH and phosphate solubilization by microorganisms

2.3 溶磷菌溶磷能力的定量测定

供试菌株在接种 48 h 后开始测定菌液中可溶性磷含量及 pH, 然后每隔 24 h 测一次。结果见表 2, 各菌株均具有较强的溶磷能力, 而且供试真菌的溶磷能力明显强于细菌。从 HN007 和 FJ002 两株 *Bacillus megaterium* 溶磷量的结果看出, 同一菌属的不同菌株, 其溶磷能力也有较大的差异。

9 株菌株在溶磷量及对应的 pH 值呈现出 3 种动

态趋势: 1) 接种到第 2 天测量数据时, 溶磷量达到了高峰, pH 值也为最低值, 随着接种时间的延长, pH 值逐渐升高, 而溶磷量也随之下落, 仅菌株 HN007 具这种趋势; 2) 随着接种时间的延长, pH 值逐渐降低, 溶磷量逐渐升高, 到达一定时间后, pH 值又具升高的趋势, 溶磷量也随之降低, 除了 HN007 外的其余细菌都呈此趋势; 3) 随着接种时间的延长, pH 值先上升, 然后逐渐降低, 而溶磷量一直上升, 真菌 FJ019 和 FJ022 均具此趋势。

大多数研究者认为微生物溶解难溶性磷酸盐的机理有两种, 一是在微生物代谢过程中产生的质子与磷矿粉中的铁、铝、钙、镁等离子交换作用^[17,18], 二是由于有机酸类物质与这些离子结合, 发生沉淀、络合、螯合反应, 从而使磷酸根释放出来^[19,20]。从本研究发现, 细菌的溶磷量与 pH 之间不存在显著的相关性($r=-0.163, P>0.05$), 而真菌的溶磷量与 pH 之间存在极显著的负相关的关系($r=-0.908, P<0.01$), 当培养液的酸度降到 pH 3.7 时, 才有大量的磷释放出来, 而溶磷量最高时培养液的 pH 仅为 3.1。

2.4 溶磷菌的优化培养

分别选用 10 g/L 的葡萄糖、蔗糖、淀粉和麦芽糖作为碳源, 溶磷菌生长 OD_{600} 结果表明(见表 3), 麦芽糖是溶磷菌生长最适合的碳源。以 0.5 g/L 的硫

表 3 不同碳源对溶磷菌菌体密度的影响
Table 3 Effect of different carbon sources on cell density

碳源 Carbon source (10 g/L)	OD_{600} (HN3-2)	OD_{600} (HN012)
Starch	0.144	0.011
Sucrose	0.290	0.232
Glucose	0.334	0.277
Maltose	0.410	0.352

表 4 不同氮源对溶磷菌生长的影响
Table 4 Effect of different nitrogen sources on cell density

氮源 Nitrogen source (0.5 g/L)	OD_{600} (HN3-2)	OD_{600} (HN012)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.159	0.014
KNO ₃	0.015	0.014
Urea	0.497	0.505
NH ₄ NO ₃	0.029	0.302

酸铵、硝酸铵、硝酸钾和尿素作为氮源供溶磷菌生长。表 4 可知尿素最适合溶磷菌的生长。

从表 6 的 K 值和极差 R 大小可知, 影响供试菌株生长的主次顺序为 $C>B>D>A$, 即 N 源 $>pH$ 值 $>NaCl>C$ 源, 各因素对其培养的影响都为极显著 ($P<0.01$), 其中尿素表现为影响溶磷菌生长的主要因素, 其次是 pH 。

表 5 正交实验因素水平

Table 5 Factors and levels employed in orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A Maltose (g/L)	B pH	C Urea (g/L)	D NaCl (g/L)
1	0.5	5	0.05	5
2	5	7	0.5	20
3	15	9	2	50

表 6 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Table 6 Results of the orthogonal test

序号 No.	A Maltose	B pH	C Urea	D NaCl	OD_{600}
1	1	1	3	2	0.025
2	2	1	1	1	0.773
3	3	1	2	3	0.238
4	1	2	2	1	0.097
5	2	2	3	3	0.003
6	3	2	1	2	0.022
7	1	3	1	3	0.407
8	2	3	2	2	0.025
9	3	3	3	1	0.002
K_1	0.177	0.345	0.401	0.291	
K_2	0.267	0.041	0.120	0.024	
K_3	0.087	0.145	0.010	0.216	
R	0.18	0.304	0.391	0.267	
最优水平 The best prescription	2	1	1	1	
主次顺序 Interrelation		C**>B**>D**>A**			

表 7 正交结果方差分析

Table 7 Variance analysis of the orthogonal test

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	方差估 计值 ms	F	显著性 Sig
A (Mal- tose)	0.145	2	0.073	11.86	**
B (pH)	0.432	2	0.216	35.34	**
C (Urea)	0.730	2	0.365	59.69	**
D (NaCl)	0.340	2	0.170	27.84	**

综合正交实验结果与方差分析表明, 本实验对供试菌株理论的最优培养基配方为 $A_2B_1C_1D_1$, 即麦芽糖 5 g/L、尿素 0.05 g/L、NaCl 5 g/L、pH 5。因此, 该条件进行了补充实验, 对优化培养配方接种活化第 2 代供试菌株 HN3-2(1%接种量), 在 30°C 下培养 48 h 后, 菌落总数可达 6.06×10^9 CFU/mL, 比 LB 和原优化前培养液(改良 SRSM 液体培养基)的培养数均高, 后两者的菌落总数分别为 3.41×10^9 CFU/mL 和 3.7×10^8 CFU/mL, 证明通过培养基优化以及正交实验, 调整后的培养配方更有利于供试菌株 HN3-2 的生长。

3 讨论

红树林由于其特殊的生态环境, 具有丰富的微生物资源供人类所探讨和利用。国内红树林溶磷菌研究相对较少, 而主要集中在农作物根际溶磷菌的研究。范丙全等^[21]发现分离自农田的 *Penicillium* spp. P8 在固体培养基上溶解 $Ca_3(PO_4)_2$ 的量达到 301 mg/mL, 其溶解骨粉、 $FePO_4$ 、 $Ca_3(PO_4)_2$ 等能力显著高于巨大芽孢杆菌 ATCC14581; 而赵小蓉等^[22]发现其分离自玉米根际的细菌对磷矿粉的最大溶磷量仅为 26.09 mg/L, 而真菌的高达 285.26 mg/L。陆俊锐等^[23]发现部分红树林溶磷细菌在培养 48 h 后, 培养液中可溶性磷含量为 21.68~86.89 μ g/mL。本研究分离出的溶磷菌中, 溶解 $Ca_3(PO_4)_2$ 能力最强的细菌 HN3-2 为 (90.95 ± 4.95) μ g/mL, 而真菌 *Penicillium* spp. HN019 溶解能力达到 (105.52 ± 1.05) μ g/mL, 与其他学者发现真菌的溶磷量明显高于细菌的结果相符^[22,24]。

有研究发现溶磷菌的溶磷量与培养液的 pH 存在一定的相关性^[3], 认为溶磷菌通过分泌大量有机酸, 与金属离子结合, 促使难溶的磷酸盐降解; 而有些研究者却认为二者之间不存在显著的相关性^[21,25], 认为微生物分泌有机酸的种类比绝对数量对溶解难溶性磷酸盐更为重要, 或溶磷菌分泌的一些非有机酸物质也能溶解部分难溶性磷。本研究发现, 虽然细菌的溶磷量与培养基 pH 呈负相关, 但相关性不显著, 而真菌与培养液 pH 存在极显著的相关性, 这可能与真菌分泌的有机酸总量比细菌分泌的大, 而且有研究也发现真菌所分泌的有机酸种类比细菌的多^[25]。同时, 在本实验过程中发现, 培养 120 h 后, 细菌培养液中的 $Ca_3(PO_4)_2$ 粉还沉淀在培养

液下, 而真菌培养液中长满了菌丝球, 而 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 粉已全部消失; 这种现象是由于 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 粉被全部降解, 还是被菌丝球包被在体内, 有待今后深入研究。

红树林造林的成活率和保存率低, 一直是我国进行红树林恢复和发展中存在的难题, 在恢复被破坏的红树林区或人工营造红树林时, 接种 PGPR 来促进红树植物幼苗的生长是提高其成活率的有效方法之一, 有关 PGPR 对红树植物的具体促生效应本实验室有开展相应的研究, 研究结果会另文发表。本实验通过对培养基的优化确定溶磷菌的最适培养基为: 麦芽糖 5 g/L、尿素 0.05 g/L、NaCl 5 g/L、pH 5, 在 30°C 下培养 48 h 后, 菌落总数可达 6.06×10^9 CFU/mL, 是原有改良 SRSM 液体培养基培养菌数的 10 倍左右, 为将来的菌肥的制备与推广提供了重要的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 邵宗臣, 赵美芝. 土壤中积累态磷活化动力学研究 I. 有机质的影响. 土壤学报, 2002, **39**(3): 318-325.
- [2] Bashan Y, Holguin G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees*, 2002, **16**: 159-166.
- [3] 林启美, 赵小蓉, 孙焱鑫, 等. 四种不同生态环境土壤中解磷细菌的数量及种群分布. 土壤与环境, 2000, **9**(1): 34-37.
- [4] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*, 1992, **24**(4): 389-395.
- [5] Whitelaw MA, Harden TJ, Bender GL. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. Nov.. *Australian Journal of Soil Research*, 1997, **35**: 291-300.
- [6] Wen PC, Tsong TK. A simple and rapid method for preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(9): 2260-2263.
- [7] 闵晓芳, 邓伯勋, 陈丽锋, 等. 柑橘后致病青霉的鉴定. 果树学报, 2007, **24**(5): 653-656.
- [8] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999, pp.221.
- [9] Vazquez P, Holguin G, Puente ME, et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils*, 2000, **30**: 460-468.
- [10] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986, pp.187-189.
- [11] Sahu S, N atarajan N, Hari K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 2002, **77**: 43-49.
- [12] 陈廷伟. 解磷巨大芽孢杆菌分类名称、形态特征及解磷性能述评. 土壤肥料, 2005, **1**: 7-9.
- [13] Promod KC, Dhevendaran K. Studies on phosphobacteria in Cochin backwater. *J Mar Biol Ass India*. 1987, **29**: 297-305.
- [14] Vazquez P, Holguin G, Puente ME, et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils*, 2000, **30**: 460-468.
- [15] Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem*, 1999, **31**: 655-665.
- [16] 李文红, 施积炎. 西湖沉积物中解磷菌的分离纯化及其解磷能力. 应用生态学报, 2006, **17**(11): 2112-2116.
- [17] Asea PEA, Kucey RMN, Stewart JWB. Inorganic phosphate solubilization by two *penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol Biochem*, 1988, **20**(4): 459-464.
- [18] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem*, 1995, **27**(3): 257-263.
- [19] Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem*, 1999, **31**: 655-665.
- [20] 林启美, 王 华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探. 微生物学通报, 2001, **28**(2): 26-30.
- [21] 范丙全, 金继运, 葛 诚. 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究. 中国农业科学, 2002, **35**(5): 525-530.
- [22] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 溶磷菌对 4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究. 微生物学报, 2002, **42**(2): 236-241.
- [23] 陆俊银, 陈俊, 康丽华, 杨振德. 华南红树林溶磷菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析及其溶磷能力. 林业科学, 2009, **45**(5): 137-142.
- [24] 林启美, 赵海英, 赵小蓉. 4 株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性. 微生物学通报, 2002, **29**(6): 24-28.
- [25] Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biochem*, 2000, **32**: 559-565.